

04940587

PRODUCTION OF 5-FLUOROURIDINE DERIVATIVE AND MEDICINE COMPOSITION

PUB. NO.: 07 -233187✓ [JP 7233187 A]  
PUBLISHED: September 05, 1995 (19950905)  
INVENTOR(s): TANAKA TOSHIO  
MATSUKAWA AKIRA  
APPLICANT(s): FUSO YAKUHHIN KOGYO KK [352627] (A Japanese Company or  
Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 06-161173 [JP 94161173]  
FILED: July 13, 1994 (19940713)  
INTL CLASS: [6] C07H-019/10; A61K-031/70; C12P-019/30; C12P-019/30;  
C12R-001/425; C12P-019/30; C12R-001/72  
JAPIO CLASS: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4 (ORGANIC  
CHEMISTRY -- Medicine); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY --  
Microorganism Industry)  
JAPIO KEYWORD: R051 (PHARMACEUTICALS -- Anti-cancer Agents)

ABSTRACT

PURPOSE: To obtain a 5-fluorouridine derivative useful for a medicine composition having carcinostatic activity industrially and advantageously by treating a strain of a bacterium which belongs to the genus Serratia or an enzyme in its cell with 5-fluorouridine in the presence of a phosphate group supplying source.

CONSTITUTION: A strain of a bacterium (e.g. Serratia.marcescens IFO3046) which belongs to the genus Serratia or an enzyme in its cell is brought into contact with 5-fluorouridine of formula I in the presence of galactose and a phosphate group supplying source (e.g. p-nitrophenylphosphoric acid) and is reacted in an aqueous medium at 47 deg.C for 24 hours while slowly shaking and the cell is removed by centrifuging. The supernatant liquid is adjusted to pH3.8 and treated with active carbon. The adsorbed substance is eluted with ethanol : ammonia water : water (50:5:45). The eluate is treated with an adsorbing resin, the adsorbed substance is eluted and purified to give the objective 5- fluorouridine-5'-phosphate of formula II ester useful as a medicine composition having carcinostatic activity.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-233187

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	P I	技術表示箇所
C 0 7 H 19/10				
A 6 1 K 31/70	ADU			
C 1 2 P 19/30		7432-4B		
// (C 1 2 P 19/30				
C 1 2 R 1:425)				

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-161173	(71) 出願人	000238201 扶桑薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(22) 出願日	平成6年(1994)7月13日	(72) 発明者	田中 俊雄 大阪府富田林市大字甲田63番地の1の601
(31) 優先権主要番号	特願平5-350129	(72) 発明者	松川 晃 大阪府堺市鳳西町1丁目54-98-406
(32) 優先日	平5(1993)12月29日	(74) 代理人	弁理士 青山 薫 (外2名)
(33) 優先権主要国	日本 (J P)		

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年3月5日、  
 社团法人日本農薬化学会発行の「日本農薬化学会誌 68  
 巻3号」に発表

(54) 【発明の名称】 5-フルオロウリジン誘導体の製造および医薬組成物

## (57) 【要約】

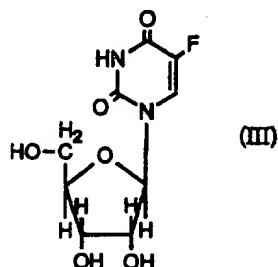
【目的】 5-フルオロウリジン-5'-モノホスフェート (5-FUMP) と5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェートガラクトース (5-FUDPGal) の微生物学的製造法および5-FUDPGalを含む制癌活性医薬組成物を提供する。

【構成】 5-フルオロウリジンにリン酸基供給源の存在下セラチア属微生物を作用させて5-FUMPを得、これにガラクトースとリン酸基供給源の存在下カンジダ属微生物を作用させて5-FUDPGal得る方法および5-FUDPGalを含む制癌活性医薬組成物。

## 【特許請求の範囲】

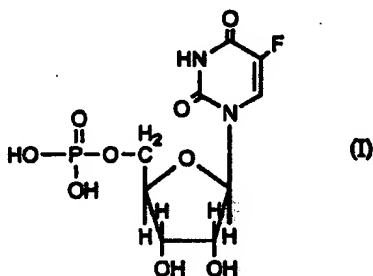
【請求項1】 セラチア (*Serratia*) 属に属する微生物  
菌株またはその体内酵素を、リン酸基供給源の存在下、  
式：

【化1】



で示される5-フルオロウリジンに作用させて、式：

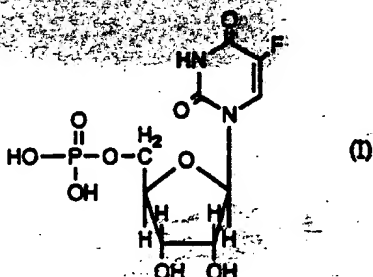
【化2】



で示される5-フルオロウリジン-5'-モノホスフェ  
ートを得ることを特徴とする、5-フルオロウリジン-  
5'-リン酸エステルの製造法。

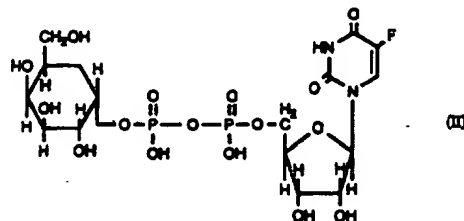
【請求項2】 カンジダ (*Candida*) 属に属する微生物  
菌株またはその体内酵素を、ガラクトースおよびリン酸  
基供給源の存在下、式：

【化3】



で示される5-フルオロウリジン-5'-モノホスフェ  
ートに作用させて、式：

【化4】



で示される5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェ  
ートガラクトースを得ることを特徴とする5-フルオロウ  
リジン-5'-リン酸エステルの製造法。

【請求項3】 5-フルオロウリジン-5'-ジホスフ  
ェートガラクトースまたは薬理的に許容され得るそれ  
らの塩を有効成分として含む抗癌活性医薬組成物。

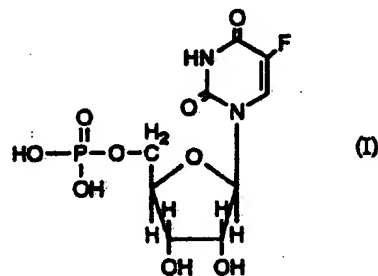
【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、5-フルオロウリジン  
-5'-リン酸エステルの製造法、具体的には、5-フル  
オロウリジン-5'-モノホスフェート (5-FUM  
P) および5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェ  
ートガラクトース (5-FUDPGal) またはその塩の微  
生物学的製造法および5-FUDPGalを有効成分とす  
る抗癌活性医薬組成物に関する。

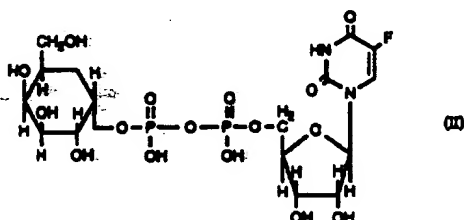
【0002】 5-FUMPは、式：

【化5】



で示される化合物であって、それ自体抗癌活性を有する  
ことが知られている。また、5-FUDPGalは、式：

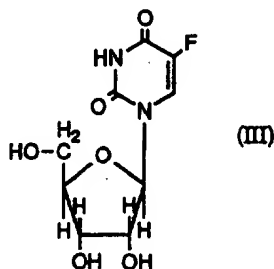
【化6】



で示される化合物であって、化合物自体は公知である。  
それ自身の抗癌活性はないが、細胞膜に存在する特異的  
なピロホスファターゼの作用で5-FUMPに変換され  
た後に抗癌活性を発揮する。

【0003】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】上記  
5-FUMPの製造法としては、式：  
【化7】



で示される5-フルオロウリジン(5-FUR)にリン酸化剤(例えばオキシ塩化リン)を反応させる方法が知られている(特開昭51-95081号)。しかしながら、この方法では、5-FUMPの他にウリジンの2'または3'位の水酸基がリン酸化された化合物が副生し、これら副生物の分離、除去には手間がかかるという難点があった。また、5-FURに対してオキシ塩化リンとトリメチルホスフェートまたはトリエチルホスフェートを作用させて5-FUMPを製造する方法も知られている(特開昭60-17000号)。この方法では、前記の副生物の生成を回避することはできるが、収率が約6%と非常に低い不利益がある。加えて、いずれの方法においても、試薬中に水分がごく僅かでも存在すれば反応が阻害されるため、5-FURをはじめとする試薬や溶媒は、予め厳密にその水分を除去しなければならないという煩雑さを伴っている。

【0004】また、5-FUDPGalや5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェートグルコース(5-FUDPGlc)のような5-FURの糖リン酸エステル(糖リン酸エステル)の製造法については、5-FUMPにモルフォリン、次いでジシクロヘキシルカルボジイミドを作用させた後、グルコース-1-リン酸を反応させることにより、5-FUDPGlcを製造する方法が知られている(特開昭60-17000号)。この製造法は、試薬として使用する糖-1-リン酸がグルコース-1-リン酸の場合には安価であるため有効な方法であると言えるが、ガラクトース-1-リン酸などその他のものである場合には極めて高価であるため、経済的な観点からその適用性が大きく妨げられる可能性がある。

【0005】本発明者らは、上記した従来技術の持つ種々の問題点を解決すべく、鋭意研究した結果、セラチア(Serratia)属に属する微生物の細胞内に存在するヌクレオシドホスホトランスフェラーゼによるリン酸基転移反応およびカンジダ(Candida)属に属する微生物の細胞内に存在するガラクトース代謝酵素系に着目し、これらを利用して5-FURの5-FUMPへの変換および

5-FUMPの5-FUDPGalへの変換を行うことに成功し、これに基づいて5-FUMPおよび5-FUDPGalの工業的な生産方法を確立するに至ったものである。

【0006】また、5-フルオロウラシル(5-FU)は核酸合成代謝拮抗剤の一種で、1957年に合成されて以来、癌組織への親和性が高く、消化器癌をはじめとして各種固形癌に対する広いスペクトルを示すことから広く臨床に供せられてきた。最近、抗腫瘍効果増強、スペクトル拡大及び副作用軽減を目指して、多くの誘導体が合成され臨床研究も進められている。

【0007】ところで、動物細胞の細胞膜には特異性の異なる数種の糖ヌクレオホスファターゼ(NPP)が存在することが知られている(W. Deppert et al.: J. Cell Physiol., 90, 41-52 (1976), Erwin Bischoff et al.: Eur. J. Biochem., 62, 279-283 (1976))。一方、本発明者の1人である田中らはある種の癌細胞の細胞膜に特異的なNPPが多く存在することを知り、さらに、5-FUDPGal等の5-FUR糖ヌクレオチドアナログがそれ自身制癌活性はないかまたは弱い、このNPPの作用で5-FUMPに変換された後に制癌活性を発揮するとの知見を得て本発明を完成した。

【0008】5-FURの糖ヌクレオチドアナログの制癌剤としての利用については、5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェートグルコース(5-FUDPGlc)が知られている(特開昭61-158925号)。しかし、これまで5-FUDPGalについての制癌活性についての開示はない。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の第1の要旨は、セラチア属に属する微生物菌株またはその体内酵素を、リン酸基供給源の存在下、5-FURに作用させて、5-FUMPを得ることを特徴とする、5-フルオロウリジン-5'-リン酸エステルの製造法、およびカンジダ属に属する微生物菌株またはその体内酵素を、ガラクトースおよびリン酸基供給源の存在下、5-FUMPに作用させて、5-FUDPGalを得ることを特徴とする5-フルオロウリジン-5'-リン酸エステルの製造法である。

【0010】本発明の第2の要旨は5-フルオロウリジン-5'-ジホスフェートガラクトース(5-FUDPGal)および薬理学的に許容され得るそれらの塩を含む制癌活性医薬組成物である。上記のような特徴を有する化合物である5-FUDPGalは、正常細胞に障害を与えず癌細胞のみを特異的に攻撃する可能性を有しており、制癌剤につきものの重篤な副作用を減少させることができる。

【0011】本発明において、出発原料として使用する5-FURは、リボースの1位の炭素原子に5-フルオ

ロウラシルが結合したものであるが、5-フルオロウラシルは、極めて有効な抗癌剤として知られている。その作用機作は生体内でリボシル化およびリン酸化を受けて5-フルオロ-2'-デオキシウリジンを5'-リン酸となり、これがデオキシウリジル酸をチミジル酸に転換するチミジル酸合成酵素を阻害することによりDNAの合成を抑制する。またRNAにもウラシルの代わりに取り込まれ、異常タンパク質合成を促して細胞を死滅させる。このことから、5-FURが5-フルオロウラシルの作用機作に依存する作用を微生物に与えるであろうことが容易に考えられる。

【0012】また、上記の5-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-リン酸は、上記のように間接的にDNA合成を抑制する以外に、DNA中に5'-チミジル酸の代わりに取り込まれ、塩基対形成に異常を引き起こす突然変異誘起性がある。5-FUMPは、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-リン酸分子中のデオキシリボース部分がリボースである以外は全く同様の構造を持つ化合物であるから、5-FUMPもまた本発明に使用する微生物に何らか（たとえばRNA合成抑制）の影響を与えるであろうことが考えられる。

【0013】このように、5-FURおよび5-FUMPは微生物に対し生育抑制など何らかの負の影響を与えるであろうことが容易に考えられる化合物であるにもかかわらず、現実には、本発明において、それらによる使用微生物に対する悪影響は実質的に認められず、5-FUMPや5-FUDPGalが良好に生産される。

【0014】本発明方法に従って、5-FURを5-FUMPに変換するには、5-FURに適当な媒質中においてリン酸基供給源の存在下にセラチア属に属する微生物またはその細胞内に存在する酵素を作用させればよい。通常は、セラチア属に属する微生物自体が使用され、その典型的な例としては、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) IFO 3046を挙げることができる。

【0015】リン酸基供給源としては、5-FURに導入されるリン酸基を供給できる物質であれば特に制限はなく、特にリン酸基を有する有機化合物、たとえばベンジルリン酸、シアノエチルリン酸、テトラクロロピロリン酸、p-ニトロフェニルリン酸などを挙げることができる。

【0016】媒質としては水性媒質が使用され、上記した5-FURとリン酸基供給源のほか、必要に応じてセラチア属微生物の生育に必要な栄養源が含まれていてもよい。水性媒質は、pH3~5、好ましくはpH4前後に調節する。反応実施に際しては、温度を約40℃~60℃、好ましくは45~50℃に保つことが望ましい。

【0017】反応後、生成した5-FUMPを精製するには、常法に準じてこれを行えばよい。たとえば、反応

液から菌体を除去して得られた液体成分を吸着剤（たとえば活性炭）に吸着、溶出させ、溶出液についてさらにイオン交換樹脂（たとえばDowex IX8 (C I型)）のカラムを用いて精製を行い、該当フラクションに吸着剤（たとえば活性炭）を加えて目的物を吸着させた後、適宜の溶離液（たとえばアンモニア水）を用いて溶出する。溶出液を適当に濃縮した後、適当な塩形成剤（たとえば酢酸バリウム、酢酸ナトリウム）を加え、さらに水混和性有機溶媒（たとえばエタノール）を加えることによって生ずる沈澱を集め、5-FUMPを塩（たとえばバリウム塩、ナトリウム塩）の形で得る。

【0018】また、本発明方法により5-FUMPを5-FUDPGalに変換するには、5-FUMPを適当な媒質中においてガラクトースとリン酸基供給源の存在下にカンジダ属に属する微生物またはその細胞内に存在する酵素を作用させればよい。通常は、カンジダ属の微生物それ自身を使用すればよく、その典型的な例は、カンジダ・サイトアナ (*Candida saitoana*) IFO 0768である。

【0019】リン酸基供給源としては、リン酸基を有する無機物が好んで使用され、その具体例としてはリン酸カリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0020】媒質としては水性媒質が使用され、上記したガラクトースとリン酸基供給源に加え、必要に応じ、使用微生物の生育に必要な栄養源を含有してもよい。

【0021】反応後、生成した5-FUDPGalを精製、回収するためには、5-FUMPの場合と同様、反応液から菌体を除去した後、吸着剤（たとえば活性炭）およびイオン交換樹脂（たとえばDowex IX8 (C I型)）のカラムを用いて処理すればよい。

【0022】本発明は、5-FUMPおよび5-FUDPGalの製造のいずれの場合も、その製造過程において取り扱い易く、かつ事後処理の面でも処理し易い水溶媒体を使用できる点で工業的に有利である。

【0023】なお、本発明において、特に5-FUMPをバリウム塩の形で採取し、必要に応じこれをそのまま使用して5-FUDPGalに変換することは、上記5-FUMPのバリウム塩が水に難溶性であるため、回収が容易であり、かつ精製が容易である点で有利である。

【0024】なお、このような水に難溶性であるバリウム塩はそのままの形ではカンジダ属の菌体中には取り込まれないことが予測され、かつそのような菌体に対し有害物質であることが予測されるにもかかわらず、現実には高収率で5-FUMPから5-FUDPGalへの変換が達成される点において、予想外の効果を奏するものといえることができる。

【0025】さらに、5-FUDPGalの合成に用いられる微生物による合成法は他の化合物にも適用ができ、糖を結合した化合物も比較的安価に合成できることから、実用的な他の5-FURの糖ヌクレオチドアナロ

グ、例えば、5-フルオロウリジノージホスフェートグルコース (5-FUDPGlc)、5-フルオロウリジノージホスフェートグルコース-N-アセチルグルコサミン (5-FUDPGlcNAc) の開発が可能である。

【0026】5-FUDPGalを含む制癌活性医薬組成物は、正常細胞に障害を与えず癌細胞のみを特異的に攻撃する可能性を有しており、制癌剤につきものの重篤な副作用を減少させることができる。

#### 【0027】制癌活性試験

5-FURおよび5-FUMPを対照物質として5-FUDPGalの培養癌細胞に対する作用について検討した。

#### 1. 材料

##### (1)細胞

##### 正常細胞

(1)NHDF細胞(正常ヒト皮膚線維芽細胞)、(2)3T3細胞(マウス線維芽細胞)

##### 腫瘍化細胞

(3)3T3細胞(SV40形質転換細胞)、(4)B16-FO細胞(マウス黒色腫細胞)、(5)LL/2細胞(マウス肺癌細胞)、(6)NS-1(マウス骨髄腫細胞)、(7)X63-Ag8(マウス骨髄腫細胞)、(8)SP2/0(マウス骨髄腫細胞-脾細胞)、(9)HeLa229(ヒト子宮頸癌細胞)、(10)K-562(ヒト白血病細胞)、(11)MOLT-3(ヒト白血病細胞)

\*以上はいずれも液体窒素細胞保存容器中に保存されていたものを、解凍して使用した。

#### (2)薬剤

5-FURはシグマケミカルより購入し、5-FUMPおよび5-FUDPGalは分与されたものである。

#### 【0028】2. 方法

(1)細胞を $5 \times 10^4$ 個/ウェルの濃度で10%FCS加MEM培地(白水製薬)に懸濁し、96ウェル平底マイクロプレート(ヌンク)に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下において24時間培養した。

(2)薬剤をMEM培地に溶かし、メンブランフィルターにより濾過除菌した後に、所定の濃度に調整し、1ウェル当たり20μlずつ分注した。

(3)37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下において所定の時間培養後、培養上清を除去しPBSで2回洗浄した。

(4)PBS中の6μM Calcein-AM(モレキュラプローブ)溶液を100μlずつウェルに分注し37℃に2時間放置した。

(5)サイトフロー2300(ミリポア)により、励起波長485nm、蛍光波長530nmにて蛍光を測定した。培地のみのウェルの蛍光強度を100とした時、薬剤を入れたウェルの蛍光強度の比を細胞の生存率(%)とした。

#### 【0029】3. 結果

結果を表に示す。

#### 【表1】

薬物添加(0.01μmol/ml)培地中で4日間培養した各種細胞の生存率(%)

細胞名	由来	5-FUDPGal	5-FUMP	5-FUR
<b>正常細胞</b>				
1. NHDF	正常ヒト皮膚線維芽細胞	69.0±12.3	20.2±0.5	20.7±2.7
2. 3T3	マウス線維芽細胞	94.2±11.7	66.6±7.8	47.5±2.6
<b>癌細胞</b>				
3. 3T3(形質転換)	SV40形質転換細胞	2.3±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1
4. B16-FO	マウス黒色腫細胞	20.2±5.6	18.6±1.0	15.4±1.7
5. LL/2	マウス肺癌細胞	11.5±2.6	6.9±0.5	4.6±0.3
6. NS-1	マウス骨髄腫細胞	56.6±3.0	54.6±0.1	54.8±0.4
7. X63-Ag8	マウス骨髄腫細胞	22.8±1.1	22.5±0.5	19.8±0.8
8. SP2/0	マウス骨髄腫細胞-脾細胞	18.0±3.0	8.5±0.1	6.4±0.3
9. HeLa229	ヒト子宮頸癌細胞	17.9±0.8	15.8±0.3	15.9±0.3
10. K-562	ヒト白血病細胞	32.3±9.4	27.3±0.8	25.8±1.3
11. MOLT-3	ヒト白血病細胞	18.0±0.3	17.8±0.3	18.0±0.3

(平均値±SD)

【0030】3T3細胞及びNHDF細胞のような正常細胞は5-FUDPGalに対しては抵抗性を示したが、5-FUR及び5-FUMPには程度の差はあるが感受性を示した。9種の癌細胞はいずれもこれらの薬剤に対して感受性を示し、生存率が低下した。特に、3T3腫瘍化細胞(形質転換)及びLL/2細胞(マウス肺癌細胞)がこれらの薬剤に対して非常に強い感受性を示し、ついでB16-FO細胞(マウス黒色腫細胞)、X63-Ag

8(マウス骨髄腫細胞)、SP2/0(マウス骨髄腫細胞-脾細胞)及びHeLa229(ヒト子宮頸癌細胞)およびMOLT-3(ヒト白血病細胞)がかなり強い感受性を示した。また、K-562(ヒト白血病細胞)およびNS-1(マウス骨髄腫細胞)が、これらの薬剤に対しても感受性を示した。

【0031】図1に0.01μmol/mlの濃度の薬剤の入った培地中で4日間培養後の細胞の感受性の差を、正常

細胞である3T3細胞およびNHDF細胞、癌細胞である3T3細胞(形質転換)、B16-F0細胞(マウス黒色腫細胞)及びLSH/2細胞(マウス肺癌細胞)について示した。3T3細胞及びNHDF細胞のような正常細胞は5-FUDPGalに対しては抵抗性を示したが、5-FUR及び5-FUMPには程度の差はあるが感受性を示した。3種の癌細胞はいずれもこれらの薬剤に対して強い感受性を示し生存率が低下することが理解される。

【0032】さらに、培地に5-FUDPGalを添加後4日間培養した時点での、細胞の生存率と薬物濃度との関係を図2に示した。0.0001μmol/ml以下の濃度では正常マウス線維芽細胞である3T3細胞及び腫瘍化した3T3細胞はともに生存率は約100%であり、低下しなかった。0.001μmol/ml以上の濃度では腫瘍化した3T3細胞の生存率は10%以下に低下したが、正常3T3細胞の生存率はやや低下したのみであった。B16-F0細胞(マウス黒色腫細胞)及びLSH/2細胞(マウス肺癌細胞)の癌細胞では0.001μmol/ml以上の5-FUDPGal濃度で生存率の急激な低下が認められた。NHDF細胞(正常ヒト皮膚線維芽細胞)は3T3細胞よりも低濃度の5-FUDPGalで生存率の低下が認められたものの、前述の癌細胞よりは感受性が低かった。

#### 【0033】4. 結論

5-FUDPGalの培養癌細胞及び正常細胞に対する作用について対照物質として、5-FUR及び5-FUMPを用い比較検討した。その結果、正常細胞は5-FUDPGalに対しては抵抗性を示したが、5-FUR及び5-FUMPには程度の差はあるが感受性を示した。癌細胞については、使用した9種類の癌細胞が、いずれもこれらの薬剤に対して強い感受性を示した。これらの結果より、5-FUDPGalは、対照とした5-FURおよび5-FUMPと比較して、正常細胞に対する毒性が弱く、5-FUDPGalの癌細胞への選択毒性を有することが判明した。

【0034】本発明の5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を実際の治療に用いる際には、患者の病態や用法に応じてさまざまな剤型のものが使用される。このような剤型の例としては、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤などの内用剤、軟膏、パップ剤などの外用剤、注射剤あるいは坐剤などを挙げることができる。

【0035】これらの医薬組成物はその剤型に応じ、製剤学上使用される手法により生理学的に許容される無毒の賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、保存剤、溶解剤などの添加剤と適宜混合し、周知の方法に従い調整することにより製造できる。

【0036】例えば散剤または細粒剤は、5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩に必要な応じ、賦形剤、結合剤、崩壊剤などの添加剤を加え、粉末また

は微粒状として散剤または細粒剤とする。また、必要に応じて着色剤、芳香剤、矯味剤などを加えることができる。さらには適当なコーティング剤で剤皮を施してもよい。

【0037】顆粒剤は、5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩に必要な応じ、賦形剤、結合剤、崩壊剤などの添加剤を加えて均等に混和した後、粒状とし、粒子をそろえて製する。顆粒剤には、必要に応じて着色剤、芳香剤、矯味剤などを加えることができる。また、適当なコーティング剤で剤皮を施してもよい。

【0038】錠剤は通例、5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩に必要な応じ、賦形剤、結合剤、崩壊剤などの添加剤を加えて均等に混和したものを顆粒状とした後、周知の方法に従い打錠して製することができる。錠剤にはまた必要に応じて着色剤、矯味剤などを加えることができる。さらに適当なコーティング剤で剤皮を施し、糖衣錠、フィルムコート錠、腸溶錠などに行うことができる。

【0039】カプセル剤は例えば、5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩に必要な応じ、適当な賦形剤などの添加物を均等に混和したもの、または粒状にしたものを適当な大きさのカプセルに充填して製する。あるいは充填内容物に腸溶性や特効性などの特性を与えるためのコーティングを施した後、充填してもよい。

【0040】坐剤は適当な基剤に必要なならば乳化剤、懸濁化剤などを加え、これに5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩を加えて混和して均等にした後、一定の形状に成型して製する。本剤には適当な剤皮で被包することができる。また、必要に応じて保存剤を加えてもよい。

【0041】注射剤は例えば、5-FUDPGalまたはその生理学的に許容される塩の一定量を溶剤に溶解、懸濁もしくは乳化して一定容量とした後、アンプルなどの注射剤用の容器に充填、密封して製することができる。あるいは、適当な賦形剤と混合後、凍結乾燥し用時溶解型の注射剤としてもよい。本剤には、所望により安定剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤などの添加剤を加えることができる。また、血液あるいは体液と等張にするための等張化剤やpHを調節するためのpH調整剤、あるいは局所麻酔剤などの無痛化剤を加えてもよい。

【0042】本発明の医薬組成物を実際の治療に用いる際の投与量は、対象となる患者の年齢、体重、性別、症状などを考慮して適宜増減されるが、一般に5-FUDPGalとして経口投与の場合、通常成人1日当たり0.5~5mg/kg体重の範囲で、非経口投与の場合、通常成人1日当たり0.2~2mg/kg体重の範囲で使用される。

【0043】また、本発明の5-FUDPGalまたはそ

の生理学的に許容される塩を有効成分とする制癌剤は、単独で用いる他に既存の制癌剤と併用あるいは配合することも可能である。係る制癌剤としては、例えばカルモフル、シタラビン、オクホスファート、テガフル、ドキシフルリジン、フルオロウラシルなどの代謝拮抗剤、シクロホスファミド、カルボニン、塩酸ニムスチン、ダカルバジン、ラニムスチンなどのアルキル化剤、マイトマイシン、クロモマイシン、アクチノマイシン、プレオマイシン、アントラサイクリン、ネオカルチノスタチンなどの抗腫瘍性抗生物質やアセグレートン、エトポシド、塩酸プロカルバジン、クエン酸タモキシフェン、塩酸ミトキサントロン、カルボプラチン、シスプラチンなどを挙げることができる。

#### 【0044】毒性試験

本発明の5-FUDPGalの急性毒性(LD<sub>50</sub>)について検討したところ、Jcl:ICR系マウスの尾静脈内に単回注入した結果、LD<sub>50</sub>値は300mg/kg以上であった。

【0045】5-FUDGalを含む制癌剤は、正常細胞に障害を与えず癌細胞のみを特異的に攻撃する可能性を有しており、制癌剤につきものの重篤な副作用を減少させることができる。

#### 【0046】

【実施例】本発明を以下の実施例で更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例により何ら制限を受けるものではない。

#### 実施例1

肉エキス5g、ペプトン15g、塩化ナトリウム5g、リン酸一水素カリウム5gを含む液体培地1リットル(pH7.0)に、あらかじめ同液体培地5mlで一晩振盪培養したセラチア・マルセッセンスIFO 3046を加え、30℃で一晩振盪培養した。培養液より菌体を遠心分離して集め、蒸留水にて洗浄した後、再び蒸留水に懸濁(500mg湿重/ml)して得る菌体懸濁液20mlを1M\*

	C	H	N	P
計算値	20.24	3.03	5.27	5.83
実験値	19.93	2.92	4.97	5.75

#### 【0049】

#### <sup>1</sup>H-NMRおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータ

炭素の位置	<sup>1</sup> H-NMR, δH (ppm, 結合定数J (Hz))	<sup>13</sup> C-NMR, δC (ppm)
6	8.11 (d, 6.4)	
1'	5.90 (dd, 4.9, 1.5)	90.79
2'	4.29 (t, 5.2)	75.86
3'	4.31 (t, 5.2)	71.98
4'	4.20 (m)	85.91 (d, 8.8)
5'	4.02 (ddd, 12.0, 5.5, 3.1)	65.97
	3.97 (ddd, 12.0, 5.5, 3.4)	

#### 【0050】実施例2

乳糖100g、ペプトン4g、酵母エキス4g、リン酸二水素カリウム4g、リン酸一水素二アンモニウム4g、硫

\*酢酸緩衝液(pH4.0)30ml、10mM硫酸亜鉛・7水和物10ml、100mM5-FUR20ml(2ミリモル)および350mMp-ニトロフェニルリン酸20mlの各溶液と混合し、反応液の全容積を水で100mlとした。本混合液を47℃で24時間ゆるやかに振盪した。反応液について高速液体クロマトグラフィーで検出を行ったところ、5-FUMPの合成効率率は84.4%であった。遠心分離によって菌体を除去した上清のpHを3.8に合わせ、クロマト用活性炭10gにて5-FUMPを吸着させた。活性炭を約1リットルの水で洗浄後、エタノール:アンモニア水:水(50:5:45)200mlで溶出した。

【0047】溶出液よりエタノールおよびアンモニアを減圧下に除去した後、Dowex IX8(3×20cm)のカラムに通して目的物を吸着させた後、1リットルの蒸留水でカラムを洗浄した。未反応の5-FURはすべてこのフラクションに回収された。次いで、0.01Nの塩酸2リットルおよび0.1Mの塩化リチウムを含む0.01Nの塩酸2リットルにて、塩化リチウム濃度0~0.1Mまでの直線的な濃度勾配をつくり、5-FUMPを溶出した。5-FUMPは、0.05Mの塩化リチウムを含むフラクションの前後に回収された。このフラクション(約1リットル)を約100mlまで濃縮した後、クロマト用活性炭10gを加えて5-FUMPを吸着させ、水1リットルで洗浄後エタノール:アンモニア水:水(50:5:45)200mlで溶出した。これを10mlまで減圧濃縮し、酢酸バリウム491mg(1.6ミリモル)を加えた。生成した沈殿を遠心分離し、エタノール:水(2:1)(20ml×2回)、更にエタノール(20ml×2回)で洗浄した。沈殿を減圧乾燥し、白色粉末状の5-FUMPのバリウム塩を得た。

【0048】収量698mg(収率65.2%)

元素分析 C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub>PF·Ba·3H<sub>2</sub>O

酸マグネシウム・水和物2gを含む液体培地(pH6.

2)2リットルにあらかじめ同液体培地100mlで一晩振盪培養したカンジダ・サイトアナIFO 0768を加



え、30℃で一晩振盪培養した。培養液より菌体を遠心分離で集め、蒸留水にて3回洗浄した後、減圧下で十分に乾燥させた。実施例1で得られた5-FUMPのバリウム塩536mg(1ミリモル)、D-ガラクトース1.8g、400mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)25ml、120mM硫酸マグネシウム・7水和物5.0mlおよび上記乾燥菌体5g(均一な状態にまで粉末化した)を混合し、さらに蒸留水を加えて全容を50mlとした反応液を30℃で14時間振盪した。反応液について高速液体クロマトグラフィーで検出した5-FUDPGalの合成効率率は94%であった。

【0051】遠心分離によって菌体を除去して得られる上清のpHを3.8とした後、クロマト用活性炭5gにて5-FUDPGalを吸着させた。実施例1に記載の方法\*

	C	H	N	P
計算値;	20.93	3.37	3.25	7.20
実験値;	20.54	3.34	3.27	7.10

【0053】

#### <sup>1</sup>H-NMRおよび<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータ

炭素の位置	<sup>1</sup> H-NMR, δH (ppm, 結合定数J (Hz))	<sup>13</sup> C-NMR, δC (ppm)
6	7.98 (d, 6.4)	
1'	6.03 (dd, 4.9, 1.83)	90.13
2'		74.99
3'		70.53
4'		84.20 (d, 10)
5'	3.89 (dt, 10.4, 3.2)	66.35 (d, 6)
	3.98 (dd, 10.4, 3.3)	
1''	5.72 (dd, 7.0, 3.4)	97.04 (d, 6)
2''		69.76 (d, 7)
3''		70.96
4''		70.72
5''		73.15
6''	3.79 (dd, 11.9, 5.5)	62.35
	3.82 (dd, 11.9, 7.3)	

【0054】

【製剤例】次に示すような処方に従い、各種製剤を製した。ただし、剤型の種類および処方はこちらに挙げたものに限るものではない。

#### 製剤例1 (散剤)

5-FUDPGal2gをとり、乳糖を加え全量を100gとし、均等に混和して散剤とした。

#### 【0055】製剤例2 (顆粒剤)

5-FUDPGal2g、乳糖70g、トウモロコシデンプン10gおよびヒドロキシプロピルセルロース5gをとり、均等に混和した後、流動層造粒機を用いて造粒した。得られた造粒物を乾燥、整粒したものに結晶セルロース12gおよびステアリン酸マグネシウム1gを加えてよく混合し、顆粒剤を製した。

#### 【0056】製剤例3 (カプセル剤)

5-FUDPGal2g、乳糖150g、結晶セルロース50

\*に従って活性炭より5-FUDPGalを溶出した。溶出液より減圧下にエタノールおよびアンモニアを除去し、さらに実施例1記載の方法に従ってDowex IX8のカラムを用いるクロマトグラフィーを行い、活性炭に吸着、溶出後、最終的にバリウム塩として5-FUDPGalの白色粉末を得た。クロマトグラフィーの条件は、実施例1と同様であるが、ただし塩化リチウムの濃度勾配は、0.05~0.1Mとした。5-FUDPGalは塩化リチウム濃度0.07Mを含むフラクションの前後で溶出し、この時点で既に5-FUMPは初期値の約1%まで減少しており、5-FUMPと5-FUDPGalを完全に分離することが出来た。

【0052】収量633mg (収率73.5%)

元素分析 C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>FO<sub>17</sub>P<sub>2</sub>・3/2Ba・4H<sub>2</sub>O

30g、ヒドロキシプロピルセルロース16g、ステアリン酸マグネシウム2gをとり、均等に混和したものをゼラチン製硬カプセルに充填し、硬カプセル剤1000カプセルを製した。

#### 【0057】製剤例4 (錠剤)

5-FUDPGal2g、乳糖140g、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース30g、ヒドロキシプロピルセルロース26gを加えて均等に混和した後、流動層造粒機を用いて造粒した。得られた造粒物にステアリン酸マグネシウム2gを加えて打錠して錠剤1000錠を製した。

#### 【0058】製剤例5 (注射剤)

5-FUDPGal1gをとり、注射用水1000mlに溶解した後、塩酸を用いてpH7.5に調節する。得られた溶液を精密濾過機にて濾過滅菌した後、容量1mlのガラス製アンプルに充填し、密封、滅菌、乾燥してア

ンプル入注射剤1000アンプルを製した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 5-FUR、5-FUMPおよび5-FUDPGalに対する正常細胞及び癌細胞の感受性の差を示す

【図1】

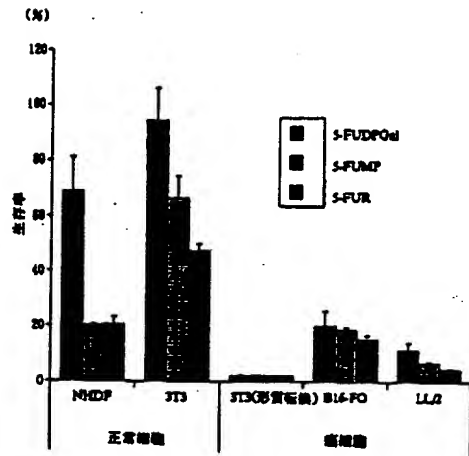


図1 細胞剤の薬剤に対する感受性の差

棒グラフである。

【図2】 5-FUDPGalの正常細胞及び癌細胞への作用を示す折れ線グラフである。

【図2】

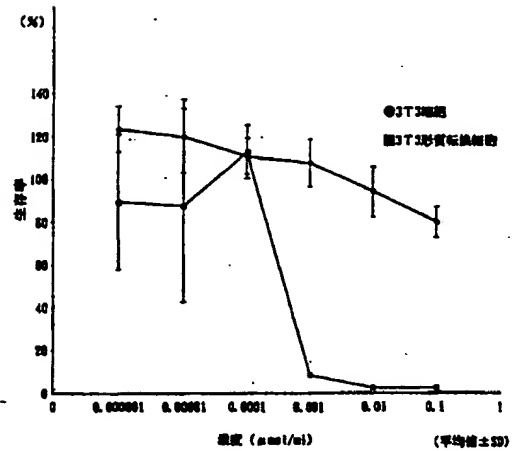


図2 5-FUDPGalの正常細胞及び癌細胞への作用

フロントページの続き

(51) Int. Cl. \*

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 19/30

C 1 2 R 1:72)

